

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Daniela Kolarczyková

Mechanismy antifungální rezistence u dermatofytů

Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Mgr. Vít Hubka, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 6. 2020

.....

Daniela Kolarczyková

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli MUDr. Mgr. Vítu Hubkovi, Ph.D. za pomoc při výběru tématu, za jeho cenné připomínky, vstřícnost a trpělivost při vedení bakalářské práce. Poděkování patří i mé rodině a blízkým za velkou podporu během mého studia a zpracovávání této práce.

Abstrakt

Pro léčbu povrchových mykotických infekcí (dermatofytóz) je k dispozici relativně široké spektrum antimykotik z různých chemických tříd. Tyto látky cílí především na různé kroky syntézy ergosterolu, čímž narušují buněčnou membránu (allylaminová, azolová a morfolinová antimykotika) nebo na funkci mikrotubulů (benzofuranová antimykotika). Navzdory tomu, že léčba dermatofytóz je často spojena s dlouhodobou expozicí houby antimykotikům (týdny až měsíce), antifungální rezistence u dermatofytů byla donedávna považována za vzácnou. Současné studie však ukázaly rostoucí výskyt chronických infekcí, reinfekcí a případů selhání léčby v důsledku objevující se rezistence k některým běžně užívaným antimykotikům. Nejzávažnějším problémem současnosti je šíření rezistence vůči terbinafinu, jejíž molekulární podstata spočívá v mutacích v genu pro enzym skvalen epoxidázu (SQLE). Nárůst výskytu této a dalších rezistencí je v současnosti alarmující zejména v Indii, zatímco situace Evropě či Americe je z pohledu citlivosti dermatofytů stále relativně příznivá. Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o antifungálních rezistencích u dermatofytů a jejich molekulárním podkladu. Práce dále shrnuje epidemiologickou situaci z hlediska výskytu a šíření těchto rezistencí ve světě.

Klíčová slova: antifungální rezistence, antimykotika, azolové deriváty, dermatofyty, griseofulvin, kožní infekce, terbinafin, *Trichophyton*

Abstract

For the treatment of superficial fungal infections (dermatophytosis) is available a wide spectrum of antifungals from various chemical groups. These antifungals are mainly focused on various steps of ergosterol synthesis, thereby disrupting the cell membrane (allylamine, azole and morpholine antifungals) and on microtubule function (benzofuran antifungals). Despite the fact that the treatment of dermatophytosis is often associated with long-term exposure of the fungus to antifungals (weeks or months), until recently antifungal resistance in dermatophytes has been considered rare. However, current studies have shown the incidence of chronic infections, reinfection and treatment failures due to emerging resistance to some commonly used antifungals. The most serious problem today is the spread of resistance to terbinafine where the molecular principles are founded in the structural changes in the squalene epoxidase enzyme (SQLE). The increase in the incidence of this and other resistances is currently alarming especially in India, while the situation in Europe and America is in terms of dermatophyte susceptibility still quite favorable. The aim of this thesis is to summarize our knowledge of antifungal resistance in dermatophytes and their molecular principles. The thesis further summarizes the epidemiological situation in terms of the occurrence and spread of the resistance in the world.

Key words: antifungal drugs, antifungal resistance, azole derivates, dermatophytes, griseofulvin, skin infections, terbinafine, *Trichophyton*

Obsah

1. Úvod.....	- 1 -
1.1. Dermatofyty a dermatofytózy	- 1 -
1.2. Antifungální rezistence u dermatofytů	- 4 -
1.3. Metody testování citlivostí k antimykotikům.....	- 5 -
1.4. Historie antifungálních rezistencí u dermatofytů	- 6 -
2. Mechanismy účinku vybraných antimykotik a molekulární podklad rezistence	- 7 -
2.1. Aylaminová antimykotika - terbinafin	- 7 -
2.1.1. Mechanismus účinku.....	- 7 -
2.1.2. Molekulární podklad rezistence	- 9 -
2.2. Azolová antimykotika	- 11 -
2.2.1. Mechanismy účinku	- 11 -
2.2.2. Mechanismus rezistence k azolovým derivátům.....	- 12 -
2.3. Griseofulvin - mechanismy účinku a podklad rezistence.....	- 12 -
2.4. Morfolinová a pyridinová antimykotika	- 13 -
3. Epidemiologická situace z pohledu výskytu rezistencí ve světě.....	- 13 -
3.1. Asie – Indie a Bangladéš, Írán a Singapur	- 13 -
3.2. Amerika - Mexiko	- 16 -
3.3. Evropa – Dánsko, Španělsko a Švýcarsko	- 16 -
4. Závěr.....	- 19 -
5. Seznam literatury.....	- 21 -

Předmluva

Problematika antifungálních rezistencí u dermatofytů je aktuálním, i když doposud spíše opomíjeným a nedostatečně probádaným tématem. Důvodu je hned několik. Rezistence vůči běžným antimykotikům je u dermatofytů obecně považována za spíše výjimečnou, přestože se in vitro testování citlivostí v rutinní praxi běžně neprovádí. Protože dermatofyty nezpůsobují život ohrožující infekce, není jim věnována taková pozornost jako houbám působícím invazivní mykózy, ať již na poli testování citlivostí (chybí jednoznačné breakpointy rezistence pro jednotlivá antimykotika) nebo výzkumu v oblasti rezistence.

Téma antifungálních rezistencí u dermatofytů jsem si zvolila kvůli jeho aktuálnosti a nedostatečnému souhrnnému zpracování v současné literatuře. Přestože se alarmující výskyt rezistence u dermatofytů v současnosti týká hlavně zemí jižní Asie, narůstající incidence rezistentních kmenů je zaznamenávána i v evropských zemích. Dá se tedy očekávat, že téma má velký potenciál do budoucna, pokud nebudou nastavena účinná opatření proti šíření rezistence. V budoucnu bych se tomuto tématu ráda věnovala i nadále, a to z hlediska zjišťování prevalence rezistence vůči terbinafinu u dermatofytů v České republice a také zkoumání molekulárních mechanismů těchto rezistencí.

1. Úvod

1.1. Dermatofyty a dermatofytózy

Dermatofyty jsou skupinou mikroskopických vláknitých hub, které zahrnují zástupce napadající keratinizované tkáně (kůži, vlasy a nehty) lidí a zvířat. Primárně patogenní druhy (zoofilní a antropofilní dermatofyty) způsobují povrchové kožní mykózy, též označované jako dermatofytózy (tinea, ringworm). Naopak geofilní dermatofyty způsobují infekce jen příležitostně a přirozeně rozkládají keratin např. v norách či hnízdech zvířat. Dermatofyty patří do třídy Eurotiomycetes, řádu Onygenales, a čeledi Arthrodermataceae. Současná taxonomie rozeznává sedm rodů dermatofytů: *Trichophyton* a *Microsporum*, zahrnující antropofilní i zoofilní druhy, antropofilní *Epidermophyton* a 4 převážně geofilní rody *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Lophophyton* a *Paraphyton*. Saprotrofní stádia životního cyklu dermatofytů rozkládají organické zbytky obsahující keratin v půdě nebo trus masožravců (koprofilní). Dermatofyty se šíří pomocí několika druhů nepohlavních spor, které vznikají holothalickou konidiogenezí. Jsou to tzv. jednobuněčné mikrokonidie, vícebuněčné makrokonidie a arthrokonidie, které jsou hlavním infekčním stádiem dermatofytů vytvářejícím se v kožních derivátech (Simpanya *et al.* 2000; Weitzman *et al.* 1995). Některé dermatofyty vytváří také pohlavní stádium. Většina druhů je tzv. heterothalických, kdy dva kompatibilní jedinci opačného párovacího typu za vhodných vytváří plodnice (tzv. kleistothecia) s pohlavními sporami-askosporami. Homothalické druhy, které jsou schopné pohlavního rozmnožování v rámci jednoho mycelia jsou u dermatofytů vzácné. Klíčovým regulátorem pohlavního rozmnožování u dermatofytů jsou tzv. MAT lokusy. Jedná se o genomické oblasti, které se u heterothalických druhů vyskytují ve dvou odlišných formách a jejich kombinace určují způsob rozmnožování a párovací typ jedince. Řada primárně patogenních antropofilních a zoofilních druhů však schopnost pohlavního rozmnožování kvůli klonálnímu šíření ztratily (v populaci zůstali jen jedinci jediného párovacího typu) (Metin & Heitman 2017; Kosanke *et al.* 2018).

Tinea patří mezi nejrozšířenější mykózy na světě. V typických případech se infekce manifestují jako ohraničená anulární ložiska (erytematózní s výraznějším okrajem a bledším centrem) až velká mapovitá ložiska. Často dochází k olupování kůže. Podle lokalizace projevů rozeznáváme tineu capitis, barbae, corporis, faciei, gladiatorum, inkognito, imbricatu, cruris, manus a pedis (Hainer *et al.* 2003).

Tinea corporis postihuje různé části trupu, končetin či krku a vyskytuje se nejčastěji u dětí. Původci infekce bývají *T. rubrum*, *M. canis*, *T. benhamie* či *T. interdigitale*. Mezi projevy

onemocnění patří svědění a tvorba anulárních ložisek s centrálním odhojováním a se zánětlivým lemem. Variantou tinea corporis je tinea faciei, která se vyskytuje na holých místech na obličeji s méně výrazným zarudnutím (Hainer *et al.* 2003). Dalším typem tinea corporis je tinea gladiatorum, která se vyskytuje v oblastech paží, krku a hlavy. Vyskytuje se hlavně u sportovců wrestlerů a je způsobená *T. tonsurans* (Adams 2002). Dalším neobvyklým typem tinea corporis je tinea incognito, která má v porovnání s ostatními mykózami odlišné projevy infekce, a to z důvodu užívání kortikosteroidů pacienty. Často se vyskytuje pouze v podobě neohrazeného difuzního erytému s folikulárními papulami a pustulami. Nejčastěji ji způsobuje *T. rubrum* a *T. interdigitale* (Polak 1999; Arenas *et al.* 2010). Poslední variantou je tinea cruris, která postihuje oblasti třísel a vyskytuje se nejvíce u dospělých osob (častěji u mužů). Projevuje se ostře ohraničenými erytematózními ložisky s vyvýšeným a zřetelným lemem. Mohou se vyskytovat papuly a pustuly. Původcem je *T. rubrum* a *E. floccosum* (Degreef 2008).

Tinea capitis se nejvíce vyskytuje u dětí. U nás ji způsobují nejčastěji zoofilní druhy *T. benhamie* a *M. canis*. Antropofilní druhy (*T. rubrum* či *T. tonsurans*) se vyskytují vzácně, a to u dospělých pacientů z ciziny či etnických menšin. Postihuje vlasaté části hlavy, ale i oblast obočí či řas. Infekce se může projevovat olupováním kůže, tvorbou šupin až krust, pustul, papul či erytémů. V těžkých případech dochází ke vzniku hnisavých bolestivých a zánětlivých abscesů. V důsledku toho může vznikat ložisková či jizevnatá alopecie (Hubka *et al.* 2018).

Tinea barbae postihuje oblast vousů, obočí i řas u mužů. Na erytematózní spodině se tvoří zánětlivé papuly až pustuly s alopetickými ložisky. Původcem je nejčastěji *T. verrucosum* a *T. mentagrophytes* (Weitzman *et al.* 1995).

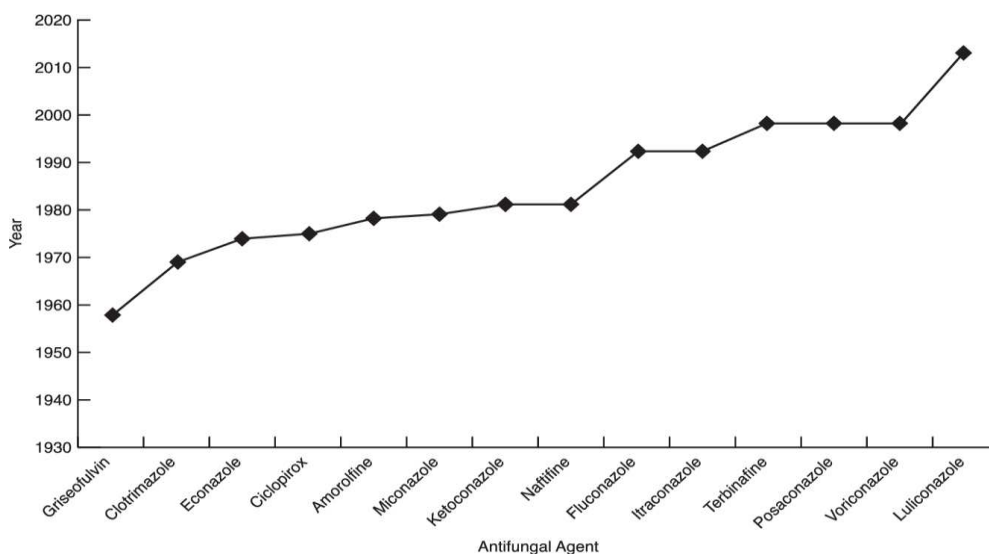
Mezi nejčastější dermatofytózy patří tinea pedis, která se vyskytuje ve všech věkových skupinách v populaci. Projevuje se chronickým olupováním kůže a také hyperkeratózou v oblasti plosek nohou a meziprstí. Nejčastějšími původci u nás jsou *T. rubrum*, *T. interdigitale* a *E. floccosum* (Weitzman *et al.* 1995).

Tinea pedis často přechází na nehty, které poškozují a přechází tak do formy onychomykózy (tinea unguium). Ta postihuje nehty na nohou a méně často i rukou a projevuje se změnou barvy (bílá až žlutá) či zhrubnutím nehtu, popřípadě jeho oddělením od nehtového lůžka (Elewski 1998).

Vzácnějšími typy jsou ještě *tinea manus* (suché léze vyskytující se v záhybech dlaní, původcem je *T. rubrum*) (Degreef 2008) a *tinea imbricata* (charakteristické koncentrické kožní léze, původcem je *T. concentricum*), která se vyskytuje pouze v tropech (Bonifaz *et al.* 2004).

V průběhu infekce nebo léčby dermatofytóz může docházet k výskytu tzv. mykidů, což jsou alergické či hyperemické reakce na produkty mykotické infekce. Postižená pokožka svědí, vznikají papuly a vezikuly. V daném místě se nevyskytují žádné houbové elementy (Ilkit *et al.* 2012; Mayser & Gräser 2020).

Dermatofytózy jsou léčeny různými třídami antimykotik. Existuje velké množství antimykotik, které se od sebe liší nejen chemickou strukturou, ale i svými mechanismy účinku. Antimykotika mají fungicidní či fungistatický efekt a jejich toxicita je pro houbové buňky mnohem vyšší než pro buňky člověka. Cílí převážně na buněčnou membránu (syntézu ergosterolu) a na mikrotubuly. Rozlišujeme lokální či systémová antimykotika. Hlavní třídy antimykotik působících na dermatofyty jsou allylaminy (terbinafin, naftifin), benzofurany (griseofulvin) a azolová antimykotika, která se ještě dělí na imidazolová (klotrimazol, ketokonazol, ekonazol, oxikonazol, flutrimazol, lulikonazol, mikonazol) a triazolová (flukonazol, itraconazol, posaconazol, vorikonazol). Dále se používá ještě hydroxypyrimidinové antimykotikum-ciklopirox a morpholinové antimykotikum-amorolfín. Jako první byl v roce 1958 vyvinut griseofulvin. Následně byla objevována další antimykotika, viz Obr. 1. Popis vlastností a mechanismů účinku nejdůležitějších tříd antimykotik bude popsán v následujících kapitolách (Suchopár *et al.* 1999; Ghannoum 2016). Důraz je kladen na antimykotika, vůči nimž jsou známy rezistence.



Obr 1: Uvedení antimykotik sloužících k léčbě dermatofytóz do klinické praxe v časové ose. Převzato z Ghannoum (2016).

1.2. Antifungální rezistence u dermatofytů

K antifungální rezistenci dochází v případě, kdy si houba (dermatofyt) vytvoří schopnost odolávat antimykotiku, které za běžných podmínek působí na kmeny daného druhu. Houba tak přežívá a dále roste. Oproti citlivým kmenům je u rezistentních kmenů zvýšena tzv. nejmenší koncentrace antimikrobiální látky (MIC, minimální inhibiční koncentrace), která inhibuje viditelný růst mikroorganismu. Při terapii je tedy třeba změnit antimykotikum za jiné, více účinné, případně zvýšit množství podávaného léčiva, pokud je to přípustné z hlediska dávkování (Pfaller 2012).

Rozlišujeme také rezistenci mikrobiologickou (u kmenu se vyskytuje genetická informace kódující daný mechanismus antifungální rezistence) a klinickou (dochází k absenci či neadekvátnímu klinickému účinku antimykotika i při vhodném dávkování a správné indikaci). V klinické praxi jsou zásadní tzv. breakpointy (hraniční hodnoty MIC), díky kterým můžeme na základě laboratorně stanovené citlivosti daného izolátu ke konkrétním antimykotikům určit, zda se jedná o rezistentní či citlivý izolát (Kolář *et al.* 2016). Tyto breakpointy však nejsou u dermatofytů zatím definovány z důvodu nedostatku studií zkoumajících korelaci mezi in-vitro stanovenými MIC a výsledky léčby v závislosti na dávce antimykotika (Dogra *et al.* 2019). V pravém slova smyslu by se tedy u dermatofytů neměl termín rezistence používat. Přesnější by bylo hovořit o MIC, které jsou u určitého kmenu zvýšené oproti očekávaným hodnotám pozorovaným u běžné citlivé populace tohoto druhu. V praxi se ale termín rezistence běžně používá u vysokých hodnot MIC. Například autoři studie Singh *et al.* (2018) považují za terbinafin-rezistentní izoláty *T. interdigitale* s hodnotami MIC > 4 µg/mL. Rezistence vůči terbinafinu byla zkoumána i u kmenů *T. mentagrophytes*, kde autoři studie Ebert *et al.* (2020) považují za rezistentní kmeny s hodnotou MIC > 0,25 µg/mL. Stejnou hodnotu „breakpointu“ pro rezistenci k terbinafinu u *T. rubrum* si stanovila i studie Saunte *et al.* (2019), přičemž izoláty s hodnotami MIC = 0,125 – 0,25 µg/mL byly označeny jako slabě rezistentní. Studie Arendrup *et al.* (2020) považovala za terbinafin-rezistentní takové izoláty *T. rubrum*, u kterých byla naměřena MIC ≥ 0,125 µg/mL a izoláty *T. interdigitale*, u kterých byla MIC ≥ 0,25 µg/mL. Ve většině klinických laboratoří není ale testování citlivostí dermatofytů vůči antimykotikům běžným standardem, proto jsou naše znalosti o výskytu rezistencí ve světě spíše útržkovité (Singh *et al.* 2018; Ebert *et al.* 2020; Saunte *et al.* 2019; Arendrup *et al.* 2020).

K projevům rezistence přispívá řada mechanismů jako například snížení absorpce léčiva houbou, strukturní změny v cílových enzymech nebo proteinech či zvýšené vypuzování léčiva

z buňky. Z molekulárního hlediska jsou příčinou těchto změn například genové mutace nebo ztráta, translokace či zmnožení genů regulujících transkripci (Hayes & Wolf 1990). Rezistence k danému léčivu může být způsobena několika molekulárními mechanismy, které mají synergický účinek (Martinez-Rossi *et al.* 2008).

Ke vzniku antifungální rezistence může dále přispívat nedokončení celého léčebného cyklu pacientem (léčba může trvat týdny až měsíce) či neadekvátní užívání léčiva (nízké dávkování, nedodržování časových rozestupů mezi dávkami, apod.). Tyto faktory přispívají k selhání terapie a nedojde tak k úplnému odstranění původce nemoci, což má za následek selekci nejodolnějších kmenů. Rezistence je také klasifikována jako přirozená nebo získaná. U přirozené rezistence daný druh toleruje konkrétní léčivo, přičemž vlastnost zodpovědná za rezistenci vznikla procesem evoluce. Získaná rezistence je ta, u které rezistentní kmen vychází z populace, která byla dříve na léčivo citlivá (Burkhart *et al.* 2002; Turnidge & Paterson 2007).

1.3. Metody testování citlivostí k antimykotikům

Citlivosti kmenů k antimykotikům můžeme měřit různými metodami. Vzhledem k nedefinovaným breakpointům u dermatofytů můžeme na rezistenci usuzovat jen orientačně. Kvalitativně lze zjišťovat citlivost daného izolátu ke konkrétnímu antimykotiku například makrodiluční diskovou difúzní metodou. Citlivost se zjišťuje měřením velikosti inhibičních zón, které se následně porovnají s referenčními hodnotami (dané výrobcem). Kvantitativně lze zjišťovat citlivost měřením MIC pomocí standarizovaných mikrodilučních metod (CLSI, EUCAST) či komerčních testů (E-test, Sensititre YeastOne) (Cuenca-Estrella & Rodriguez-Tudela 2010).

Mezi standardizované mikrodiluční metody patří EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Jedná se o standardizované metodiky testování citlivostí, které se aplikují v makrodilučních i v mikrodilučních metodách. MIC se měří pomocí mikrotitrační destičky s jamkami obsahující médium, ve kterém jsou naředěny vzrůstající koncentrace daného antimykotika. Po nanesení inokula se hodnotí zákal v jamce, který určí, zda je testovaný kmen rezistentní či citlivý. Taková koncentrace, která zastaví růst (jamka je čirá), je vyhodnocena jako MIC. Obě tyto metody se od sebe liší jak svým původem, tak velikostí inokula a složením média v jamkách, inkubační dobou a tvarem dna mikrotitračních destiček (Arendrup *et al.* 2020; Pfaller 2012).

Komerční metodou je například E-test. Jedná se o makrodiluční metodu, která slouží k měření MIC. Používá se speciální proužek se stupnicí, který je napuštěný rostoucími koncentracemi antimykotika. Ten se následně přiloží na médium s konkrétním izolátem. Okraj inhibiční zóny se detekuje na stupnici přiloženého proužku a odečtením se určí MIC (Schindler 2010). Také zde patří mikrodiluční metoda Sensititre YeastOne, což je kolorimetrický test v podobě mikrotitrační destičky s jamkami, které obsahují konkrétní antimykotikum včetně kolorimetrického indikátoru pH. Pokud daný kmen roste, jamka změní barvu z modré na růžovou díky oxidačně-redukčním reakcím (Pujol *et al.* 2002).

1.4. Historie antifungálních rezistencí u dermatofytů

Mezi první záznamy o antifungální rezistenci u dermatofytů patří studie z roku 1960 z Anglie, kde byla zaznamenána rezistence vůči griseofulvinu u pacientů s dermatofytózou, která byla způsobena *T. rubrum* a *M. canis*. Na povrch agarového média porostlého testovaným kmenem byla aplikována vrstva média obsahující konkrétní koncentraci griseofulvinu. Pokud izolát prorostl touto vrstvou, byl označen jako rezistentní (Aytoun *et al.* 1960). Mezi další rané zmínky o rezistenci se řadí studie z Atlantý (USA) (Granade *et al.* 1980), která zkoumala rezistence vůči griseofulvinu, klotrimazolu, ketokonazolu a mikonazolu. MIC byla určována pomocí mikrotitrační destičky. U griseofulvinu byla maximální hodnota MIC >18 µg/mL a u azolových antimykotik dosahovala MIC ~1,0 µg/mL. Tyto hodnoty se vyskytovaly jen u *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, *M. canis* a *T. tonsurans* (Granade & Artis 1980). Rezistence vůči mnoha azolovým antimykotikům byla zachycena v roce 2004 ve Španělsku. Kmeny *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton* byly testovány pomocí difúzní metody NeoSensitabs (Carrillo-Muñoz *et al.* 2004).

První terbinafinová rezistence se potvrdila u kmenů *T. rubrum* ve studii Mukherjee *et al.* (2003) z USA. Od pacientů trpících onychomýkózou byly izolovány kmeny, u kterých byly pomocí mikrodiluční a makrodiluční metody určeny MIC, které přesahovaly 4 µg/mL (Mukherjee *et al.* 2003). Molekulární podklad rezistence nebyl v této, ani v předchozích studiích molekulárně doložen a měření MIC bylo prováděno pouze dilučními či difúzními metodami, které byly odlišné od současných standardů.

Molekulární podklad rezistence poprvé zkoumala až studie Osborne *et al.* (2005), kdy byl u terbinafin-rezistentního *T. rubrum* sekvenován gen pro skvalen epoxidázu. Byla zde objevena AMK substituce Leu393Phe, která komplikuje vazbu terbinafinu ke SQLE a je zodpovědná za rezistenci (Osborne *et al.* 2005). Také studie Cervelatti *et al.* (2006) molekulárně potvrdila

rezistenci *T. rubrum*, a to konkrétně vůči ketokonazolu, flukonazolu, itraconazolu a griseofulvinu. Pomocí metody PCR a specifických primerů byla detekována zvýšená exprese genu *TruMDR1* po expozici zmíněným antimykotikům. Gen *TruMDR1* kóduje ABC transportéry, které jsou zodpovědné za vypuzování léčiva z buňky a je tedy příčinou rezistence (Cervelatti *et al.* 2006).

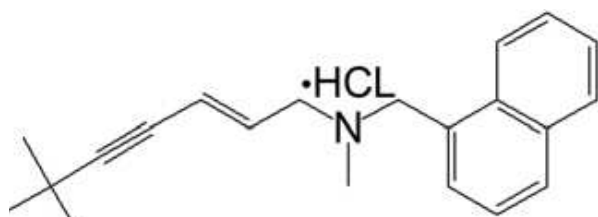
V posledních letech se antifungální rezistence u dermatofytů vyskytují mnohem častěji, než tomu bylo dříve. Z dosavadních studií vyplynulo, že dermatofyty dovedou vyvinout mechanismy rezistence vůči většině dostupných tříd antimykotik, díky kterým dokážou odolávat léčivu. Léčba dermatofytóz často trvá řadu týdnů až měsíců a dlouhodobé vystavování dermatofytů účinkům léčiva vede k selekci odolnějších kmenů. Nedostatečně vysoké dávkování léčiv, či nedostatečná compliance pacientů může rozvoji rezistence výrazně napomoci. Z hlediska prevalence rezistence je epidemiologická situace nejzávažnější v Indii, což je zřejmě způsobeno lokálními specifiky v léčbě a dostupnosti léků. V Evropě či USA se rezistence u dermatofytů vyskytují méně často, ale i zde počty takových záchytů výrazně stoupají. Situace v České republice zatím nebyla z pohledu výskytu zkoumána. Epidemiologickou situaci ve světě z pohledu šíření rezistencí podrobněji rozvádí třetí kapitola. Následující kapitola rozvádí mechanismy účinku jednotlivých léčiv a molekulární podklad rezistence k nim.

2. Mechanismy účinku vybraných antimykotik a molekulární podklad rezistence

2.1. Allylaminová antimykotika - terbinafin

2.1.1. Mechanismus účinku

Terbinafin patří mezi vysoce účinná allylaminová antimykotika. Je podáván jako terbinafin hydrochlorid systémově v tabletové formě, ale i lokálně ve formě krému nebo kožního roztoku. Bývá lékem první volby při terapii mykóz nehtů či vlasů působených dermatofyty. Nejvíce účinný je na rod *Trichophyton* (Singh *et al.* 2018).

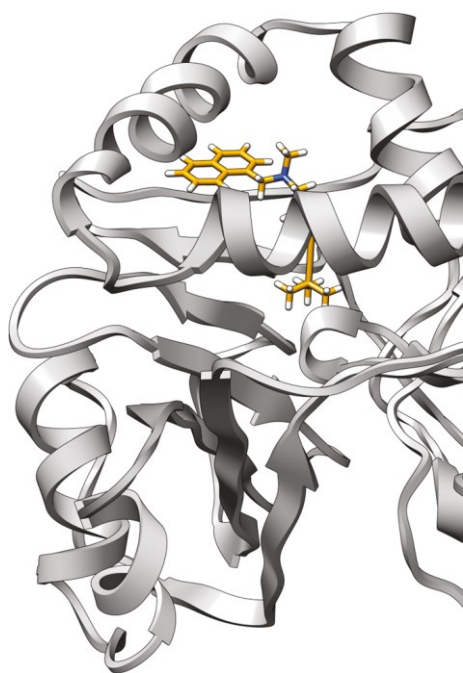


Obr. 2: Struktura terbinafin hydrochloridu. V levé části molekuly se nachází hydrofobní, lipofilní isobutanová skupina, napravo je navázán naftalen se stejnými vlastnostmi. Uprostřed se nachází terciální amin s volným elektronovým párem, pomocí něhož je možné převést terbinafin na sůl reakcí s kyselinou chlorovodíkovou. Tato sůl se používá v systémové

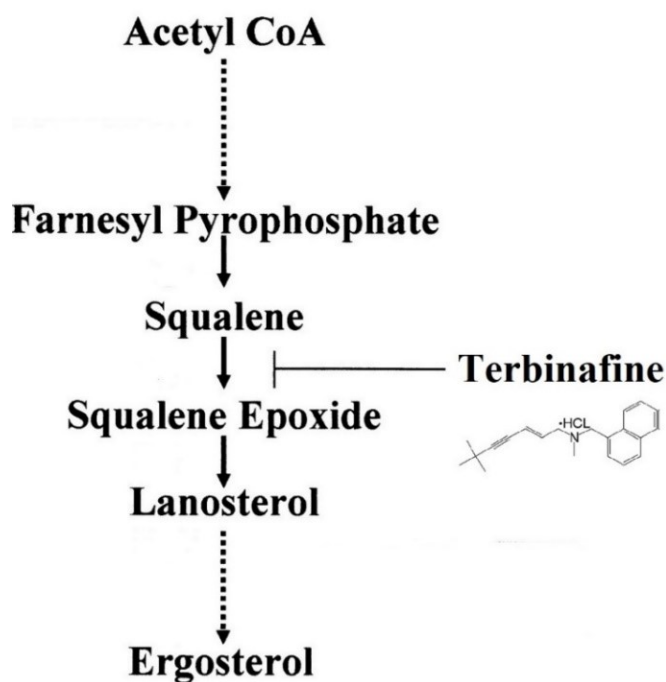
lčbě z důvodu lepší rozpustnosti léčiva ve vodě. Terbinafin, který není ve formě soli se využívá v lokální lčbě (Nair *et al.* 2009). Převzato a upraveno ze Zhang *et al.* (2012).

Terbinafin má vysokou afinitu k enzymu skvalen epoxidáze (SQLE), který inhibuje. Důsledkem inhibice je zablokování syntézy skvalen epoxidu, který je prekurzorem biosyntetické dráhy ergosterolu (Obr. 4). Ten má funkci v udržování membránové fluidity permeability (Zhang & Rao 2010). Dochází tedy k vyčerpání zásob ergosterolu a k nahromadění skvalenu, který zvýší permeabilitu buněčné membrány, což vede ke smrti buněk (Ryder *et al.* 1992).

Vazba terbinafinu ke SQLE je uskutečněna pomocí vodíkových vazeb, kdy hydrofobní část terbinafinu s isobutanovou skupinou je vertikálně umístěna ve vazebné kapse SQLE a je orientována směrem k enzymovému centru. Hydrofobní část terbinafinu obsahující naftalen je umístěna v horní části vazebné kapsy a způsobuje zde konformační změny (Obr. 3). Taková poloha molekuly terbinafinu způsobuje změny konformace SQLE a zabraňuje jejímu přirozenému substrátu (skvalenu) se navázat do aktivního centra enzymu (Nowosielski *et al.* 2011). Na houbovou SQLE terbinafin působí nekompetitivní cestou, kdežto na tu savčí působí kompetitivně (Favre & Ryder 1997).



Obr. 3: Orientace terbinafinu uvnitř SQLE u *Saccharomyces cerevisiae*. Převzato z Nowosielski *et al.* (2011).



Obr. 4: Působení terbinafinu v biosyntéze ergosterolu. Převzato a upraveno z Onyewu *et al.* (2003).

2.1.2. Molekulární podklad rezistence

Mechanismus rezistence k terbinafinu byl dosud popsán u klinických kmenů *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. benhamie*, *T. indotinae* a *Microsporum canis* (Singh *et al.* 2018; Saunte *et al.* 2019; Khatri *et al.* 2017; Carrillo-Muñoz *et al.* 2004; Kano *et al.* 2020). Konkrétně u druhu *T. rubrum* byly objeveny bodové mutace v genu pro SQLE vedoucí k substituci vždy jedné z aminokyselin, např. Leu393, Phe397, Phe415 a His440 ve SQLE. O první konkrétní mutaci pojednává studie Osborne *et al.* (2005), která našla missense mutaci aminokyseliny Leu393Phe (záměna leucinu v pozici 393 za fenylalanin) a později Osborne *et al.* (2006) uvádí missense mutaci Phe397Leu. U kmenu *T. interdigitale* byly obě tyto substituce lokalizovány na karboxylovém C-terminálním úseku SQLE, který je nezbytný pro vazbu terbinafinu. Tato doména těsně přiléhá k vysoce konzervované AMK sekvenci, která se vyskytuje ve všech organismálních typech SQLE a slouží jako vazebné místo pro substrát. Konformační změny spojené s těmito mutacemi zásadně snižují afinitu léčiva k danému enzymu, což se projevuje ve zvýšené MIC vůči terbinafinu a v rezistentním fenotypu daného kmenu (MIC až 100-krát vyšší než u kmene citlivého) (Osborne *et al.* 2005; Singh *et al.* 2018).

Kano *et al.* (2020) pro tyto rezistentní kmeny „*T. interdigitale*“, které se liší od *T. interdigitale* několika substitucemi v ITS oblasti rDNA, navrhl nové jméno *Trichophyton indotinae* (Kano *et al.* 2020).

V dánské studii (Saunte *et al.* 2019) byly objeveny další substituce v SQLE, a to Ile121Met, Val237Ile a Phe484Tyr. Pozice Ile121 a Val237 leží v těsné blízkosti vazebného místa pro terbinafin stejně jako Phe397 a Leu393, a také obsahují nepolární alifatické postranní řetězce. Proto mohou podobně ovlivňovat afinitu terbinafinu ke SQLE a tím MIC daného kmenu. Substituce Phe415Ser a His440Tyr nejsou tak časté a je u nich nižší MIC než u výše jmenovaných. Přesto mohou vést k selhání léčby. Také substituce Phe484Tyr nemusí být z hlediska rezistence k terbinafinu významná, vyskytuje se totiž velmi zřídka a hodnoty MIC nejsou výrazně zvýšené (Saunte *et al.* 2019).

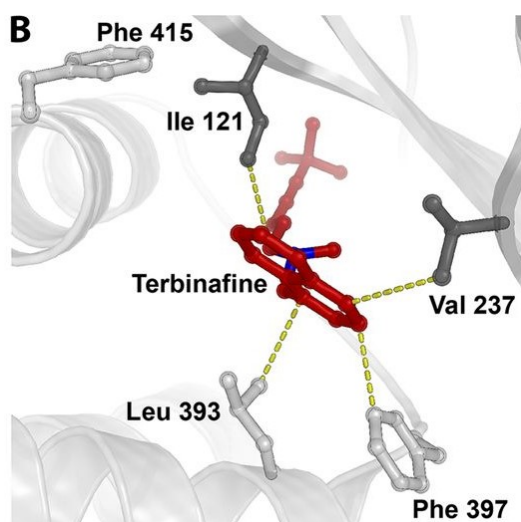
Znamé aminokyselinové substituce v enzymu SQLE u dermatofytů jsou znázorněny na Obr. 5 a shrnuty v Tabulce 1. Z dat vyplývá, že u nejběžnějších substitucí (Phe397Leu a Leu393Phe) jsou hodnoty MIC vyšší než u zbylých substitucí, které mají vyšší citlivost

k antimykotikům. Přesto jsou všechny tyto mutace zásadní při léčbě mykotických onemocnění a mohou významně ovlivnit úspěšnost terapie.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace terbinafinu zjištěné u klinických izolátů dermatofytů s aminokyselinovými substitucemi v enzymu skvalen epoxidáze (SQLE)

Druh	MIC (mg/L) ¹	Substituce	Literatura
<i>T. interdigitale</i>	≥32	Phe397Leu	Singh <i>et al.</i> (2018)
<i>T. interdigitale</i>	≥32	Leu393Phe	
<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i>	>8/ 16	Leu393Phe	Ebert <i>et al.</i> (2020) Saunte <i>et al.</i> (2019)
<i>T. rubrum</i>	8 / >8	Phe397Leu	Saunte <i>et al.</i> (2019)
<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i>	8	Phe397Leu	Ebert <i>et al.</i> (2020) Singh <i>et al.</i> (2018)
<i>T. interdigitale</i>	8	Leu393Phe	Singh <i>et al.</i> (2018)
<i>T. interdigitale</i> , <i>T. rubrum</i>	4 / >4	Phe397Leu	Saunte <i>et al.</i> (2019) Singh <i>et al.</i> (2018)
<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>	0,5-2	Leu393Ser	Saunte <i>et al.</i> (2019) Ebert <i>et al.</i> (2020)
<i>T. mentagrophytes</i>	1	Gln408Leu	Ebert <i>et al.</i> (2020)
<i>T. mentagrophytes</i>	0,25	Leu335Phe	
<i>T. mentagrophytes</i>	0,25	Ser443Pro	
<i>T. mentagrophytes</i>	0,25	His440Tyr	
<i>T. rubrum</i>	0,125	His440Tyr/Phe484Tyr	Saunte <i>et al.</i> (2019)
<i>T. rubrum</i>	0,125	Ile121Met/Val237Ile	
<i>T. rubrum</i>	0,125	Phe415Ser	
<i>T. mentagrophytes</i>	0,125	Ala448Thr	(Ebert <i>et al.</i> 2020)

¹ Testováno mikrodilučními metodami EUCAST a CLSI



Obr. 5: 3D struktura skvalen epoxidázy se zaměřením na aminokyselinové substituce přiléhající k vazebnému místu pro terbinafin. Žluté čáry znázorňují vzdálenost daných aminokyselinových zbytků od terbinafinu (zhruba 3-4 Å). Převzato ze Saunte *et al.* (2019).

2.2. Azolová antimykotika

2.2.1. Mechanismy účinku

Azolová antimykotika rozdělujeme na imidazolová a triazolová. Tyto skupiny se od sebe liší svojí stavbou, velikostí, hydrofobicitou a lipofilií. V molekulách imidazolů se vyskytují dva atomy dusíku v pětičlenném heterocyklu, zatímco u triazolů se v tomto heterocyklu vyskytují tři atomy dusíku. Imidazoly se používají jako lokální antimykotika z důvodu jejich významné biotransformace v organismu, která zabraňuje dosažení účinných koncentrací léčiva v tkáních. Výjimku tvoří mikonazol a ketokonazol, který dosahuje účinných koncentrací i při systémové léčbě (ketokonazol se v ČR systémově nepožívá pro jeho hepatotoxické účinky). Imidazolovými antimykotiky jsou: mikonazol, ekonazol, klotrimazol, sertakonazol, bifonazol, isokonazol, oxikonazol, fentikonazol a ketokonazol. Triazolová antimykotika, jako je například flukonazol, vorikonazol či itraconazol, se využívají v systémové léčbě. Mají totiž velmi dobré farmakokinetické vlastnosti, dobře pronikají do tkání, kde dlouho přetrvávají a dosahují zde dostatečných účinných koncentrací. Také jsou o dva řády více antifungálně specifické (působí selektivněji na fungální enzym) než imidazoly, a tudíž jsou lépe tolerovány a mají minimální nežádoucí účinky. Ke flukonazolu vykazuje většina dermatofytů přirozenou rezistenci, proto se v léčbě dermatofytóz nepoužívá (Suchopár *et al.* 1999; Zonios & Bennett 2008).

V houbových buňkách se vyskytuje enzym cytochrom P450 dependentní C14 α -demetyláza, který katalyzuje přeměnu lanosterolu na ergosterol. Imidazolová i triazolová antimykotika inhibují C14 α -demetylázu a tím blokují biosyntézu ergosterolu. Dusíkaté heterocykly molekul azolů se vážou na hem cytochromu P450 a blokují jeho katalytickou funkci. Nedostatek

ergosterolu a akumulace prekurzorů ergosterolu vede ke změně struktury a funkce plazmatické membrány. Dochází k membránovému rozpadu, postupnému odumírání mitochondrií a následně k buněčné smrti (Marriott 1980).

2.2.2. Mechanismus rezistence k azolovým derivátům

Rezistence k azolovým derivátům u dermatofytů byla popsána u *T. rubrum*. Mechanismus rezistence u dermatofytů nespočívá v mutaci genu *CYP51*, jako je tomu u aspergilů, ale souvisí se zvýšenou expresí transmembránových transportérů (ABC transportéry, efluxní pumpy) kódovaných geny *TruMDR1*, *TruMDR2*, *TruMDR3* a *TruMFS2*. Monod *et al.* (2019) uvádí, že u rezistentních kmenů se vyskytovala nadměrná exprese genu kódujícího C14 α -demethylázu a také exprese genu *TruMDR3*, který spolu s *TruMDR2* zodpovídají za rezistenci u *T. rubrum*. Při vyřazení genu *TruMDR3* u rezistentního kmenu *T. rubrum* TIMM20092 se kmen stal citlivým vůči vorikonazolu. U itraconazolu došlo pouze ke snížení rezistence, a to z důvodu exprese genu *TruMDR2*, který kóduje efluxní pumpy, které přednostně vypuzují právě itraconazol (Fachin *et al.* 2006; Monod *et al.* 2019).

2.3. Griseofulvin - mechanismy účinku a podklad rezistence

Griseofulvin je metabolitem *Penicillium griseofulvum* a *Penicillium janczewskii* a jeho účinky jsou fungistatické. Používá se při léčbě tinea corporis, pedis, cruris, barbae, capitis či onychomykózy. Užívá se v tabletové formě a proniká do všech tkání v těle. Zásadní je jeho ukládání do stratum corneum a do vlasových folikulů, kde inhibuje růst houbových buněk (Becker 1984; Araujo *et al.* 1990).

Mechanismus účinku spočívá ve schopnosti měnit stavbu mikrotubulů v buňce a narušovat jejich dynamiku. Griseofulvin působí v místě mikrotubulové podjednotky (dimer α - a β - tubulinu). Zde se váže na rozhraní těchto dvou globulárních proteinů a ovlivňuje tak stabilitu, délku, polymeraci a depolymeraci mikrotubulů. Proces zkracování a růstu mikrotubulů je tedy výrazně pomalejší. Důsledkem je například porucha tvorby dělicího vřeténka, kdy vznikají multipolární dělicí vřeténka, vyskytují se špatně seřazené chromozomy v metafázi buněčného dělení nebo jsou chromozomy nesprávně segregované do gamet. Všechny tyto jevy vedou k celkové mitotické zástavě a odumírání buněk. Dnes se griseofulvin v ČR nepoužívá pro jeho nežádoucí vedlejší účinky. V zahraničí je ale v některých indikacích používán běžně, např. v Německu, Francii, Velké Británii, USA, Kanadě, Japonsku, Číně, Indii či Austrálii (Rathinasamy *et al.* 2010).

Antifungální rezistence byla pozorována u *T. rubrum* a *T. interdigitale*. Při expozici rezistentních kmenů griseofulvinu byla zjištěna zvýšená akumulace transkriptů genů *pdr1* a *mdr2* (konkrétně u *T. interdigitale*) a *TruMDR1* (*T. rubrum*). Tyto geny kódují efluxní ABC transportéry zodpovědné za vypuzování léčiva z buňky (Fachin *et al.* 2006; Martins *et al.* 2016).

2.4. Morfolinová a pyridinová antimykotika

Dermatofytózy se léčí také antimykotiky z jiných chemických tříd, např. amorolfinem (morfolinový derivát) a ciklopiroxem (hydroxypyrimidinový derivát).

Amorolfin inhibuje enzym Δ_{14} reduktázu a Δ_{8-7} izomerázu, čímž dochází k narušení syntézy ergosterolu, vyčerpání jeho zásob a akumulaci ignosterolu v buněčné membráně. Má fungistatické a fungicidní účinky a používá se jako lokální antimykotikum. Je účinný na dermatofyty, ale i na kvasinky či aspergily. Využívá se hlavně v léčbě onychomýkóz (např. v podobě laku na nehty) (Polak 1992).

Mechanismus účinku ciklopiroxu spočívá v jeho vysoké afinitě k trojmocným kationtům Fe^{3+} , které jsou nezbytnými kofaktory v enzymech, jako jsou např. cytochromy. Jejich narušením je ovlivněn buněčný metabolismus, který souvisí s elektron-transportními procesy v mitochondriích. Ciklopirox navíc redukuje aktivitu enzymů katalázy a peroxidázy, které jsou zodpovědné za degradaci toxických peroxidů uvnitř buňky. Má fungicidní účinky a používá se v lokální léčbě. Působí na dermatofyty, kvasinky, aspergily, ale i na široké spektrum bakterií. Používá se při léčbě dermatofytóz či kandidóz (Bohn & Kraemer 2000).

Případy selhání léčby se vyskytují velmi zřídka a k těmto třídám antimykotik doposud nebyla objevena antifungální rezistence, proto se jimi dále tato práce nezabývá (Subissi *et al.* 2010; Georgopapadakou & Walsh 1996).

3. Epidemiologická situace z pohledu výskytu rezistencí ve světě

3.1. Asie – Indie a Bangladéš, Írán a Singapur

Prevalence dermatofytóz ve světové populaci je zhruba 25 %, přičemž v Indii dosahuje až 40% (Kalita *et al.* 2019). Mezi nejčastější klinické typy dermatofytózy v Indii patří tinea cruris a tinea corporis. Hlavními původci dermatofytóz v Indii jsou *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* a *T. interdigitale*. Dále pak také *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *Microsporum canis*, *M. audouinii* a *Nannizzia gypsea* (*Microsporum gypseum*) (Dogra & Uprety 2016). V posledních desetiletích byl zaznamenán zvyšující se počet obtížně léčitelných a recidivujících případů, a také

atypických forem s neobvyklými příznaky (Dogra & Narang 2017). K chronickým infekcím (neúspěšně léčené po dobu delší než šest měsíců) mají predispozice hlavně imunokompromitovaní pacienti, diabetici, atopici a pacienti léčení kortikosteroidy (Sentamilselvi *et al.* 1998).

Problém s léčbou dermatomykóz v Indii začal již v roce 2010 a v následujících letech se situace výrazně zhoršila. Na dermatologických klinikách je zaznamenáván výskyt obtížně léčitelných dermatofytóz u 15–20 % pacientů všech věkových kategorií, včetně dětí a těhotných žen. Lékaři se také musí potýkat s kontraindikacemi antimykotické léčby u řady pacientů, nedodržováním nebo odmítáním léčby nebo s finančními problémy, což vede k dalšímu šíření a udržování nemoci v populaci. Pacienti se také často uchylují k alternativní medicíně, léčitelství či k náboženským postupům, jako jsou například posvátné koupele, což může onemocnění dále zhoršovat (Sahoo & Mahajan 2016; Dogra & Uprety 2016).

V Indii je také teplé a vlhké klima, které napomáhá šíření mykóz. Dále bývá příčinou vysoké prevalence infekcí špatná a nedostatečná hygiena, vysoká hustota obyvatelstva a také sdílení oblečení či obuvi mezi osobami. (Dogra & Uprety 2016).

Dalším problémem bývá také neadekvátní léčba dermatofytóz, které mohou být zaměňovány za jiná kožní onemocnění (erythema multiforme, seboroická dermatitida, lupus erythematosus, dermatitis herpetiformis, rosacea, ekzém, lupénka či impetigo), která jsou běžně léčená kortikosteroidy (Sahoo & Mahajan 2016). Ty mají ve vyšších koncentracích schopnost inhibovat houbový růst díky svým cytostatickým účinkům. Lidská pokožka ovšem dokáže absorbovat pouze nízkou koncentraci léčiva. Kortikosteroidy v nízkých koncentracích působí na houbu naopak stimulujícím efektem. Navíc slouží pouze k léčbě chronických zánětů neinfekčního původu a mají imunosupresivní efekt. U pacientů s dermatofytózou léčených kortikosteroidy se výrazně mění klinický obraz mykózy, který se následně od typických forem velmi liší. Takové formy dermatofytóz bývají označovány jako tzv. tinea inkognita (Erbagci 2004).

Lékaři také aplikují na pacienty léčbu kombinací antibiotik, antimykotik a kortikosteroidních krémů. Pacienti se často takto léčí sami, protože tyto kombinované přípravky bývají v těchto zemích dostupné volně bez lékařského předpisu za poměrně nízkou cenu (Verma & Vasani 2016). Uvedené nesprávné léčebné postupy zásadně ovlivňují úspěšnost terapie a způsobují hojný výskyt tinea inkognito, která je obtížně léčitelná. Účinkem zmíněných

kombinací léčiv dochází k zásadnímu imunitnímu oslabení organismu, což přispívá ke vzniku rezistence u dermatofytů.

Například studie Sultana *et al.* (2019) z Bangladéše uvádí, že u 66 % pacientů léčených kombinací kortikosteroidů a antimykotik selhala léčba. Také zjišťovali klinickou rezistenci na různá antimykotika u pacientů trpících dermatofytózami. U 89 pacientů trpících tineou corporis, cruris, faciei, manus a pedis selhala léčba u 18 (20 %) případů léčených terbinafinem. U 53 pacientů léčených flukonazolem selhala léčba v 18 (34 %) případech. Vysoké procento neúspěšné léčby bylo také u itrakonazolu -13 případů (77 %) z 17. U griseofulvinu došlo k selhání u 9 případů z 35 (26 %). Celková klinická rezistence na tato antimykotika byla 29 % (Sultana & Wahiduzzaman 2018).

Další studie Khatri *et al.* (2017) zaznamenala zvýšené množství rezistentních kmenů v indickém Rajahstanu. Diskovou difúzní metodou bylo zkoumáno 75 izolátů. Rezistence se vyskytla u kmenů *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *M. gypseum* a *E. floccosum*. Počet rezistentních případů je shrnut v Tabulce 2. Nejčastěji se vyskytovala rezistence vůči flukonazolu (až 81 % u kmene *T. mentagrophytes*), poté bylo mnoho kmenů rezistentních k terbinafinu (až 78 % u *T. verrucosum*) a také ke klotrimazolu (39 % rezistentních kmenů *T. rubrum*). Je tedy zřejmé, že neadekvátní léčebné postupy v Indii vedly k významnému rozšíření rezistence vůči širokému spektru antimykotik (Khatri *et al.* 2017).

Singh *et al.* (2018) uvádí terbinafinovou rezistenci měřenou mikrodiluční metodou u kmenů *T. interdigitale* získaných ze tří nemocnic v Delhi v Indii. Dvacet izolátů (32 %) z 63 bylo rezistentních k terbinafinu. Na flukonazol bylo rezistentních 30 izolátů (48 %) (Singh *et al.* 2018).

Rudramurthy *et al.* (2018) popisuje terbinafinovou rezistenci (mikrodiluční metoda) u 15 (17 %) z 88 izolátů *T. interdigitale* a pěti (14 %) z 35 izolátů *T. rubrum* (Rudramurthy *et al.* 2018).

Ve studii Singh *et al.* (2019) bylo během pěti let (2014-2018) zkoumáno 166 izolátů *Trichophyton sp.* od pacientů z pěti nemocnic v severní Indii. Po testování citlivosti 129 izolátů mikrodiluční metodou bylo zjištěno 36 % případů terbinafinové rezistence, 40 % případů rezistence na flukonazol a 56 % na griseofulvin (Singh *et al.* 2019).

Poslední studie Ebert *et al.* (2020) testovala terbinafinovou rezistenci u 297 izolátů od pacientů z osmi lokalit v Indii během dvou let (2017-2019). Pomocí mikrodiluční metody CLSI byly stanoveny MIC a screeningem byly detekovány AMK substituce. U kmenů *T. rubrum* byla potvrzena rezistence k terbinafinu u 8 izolátů z 18 (44 %) a u *T. mentagrophytes* byla zjištěna rezistence u 202 izolátů z 279 (72 %) (Ebert *et al.* 2020).

V souhrnu se dosahuje rezistence k terbinafinu v Indii a Bangladéši 17-32 % u kmenů *T. interdigitale*, 61-72 % u *T. mentagrophytes* a 14–31 % u *T. rubrum*.

Laboratoř na lékařské fakultě v Shirazu v jižním Íránu také zkoumala antifungální rezistenci u dermatofytů, a to pomocí diskové difúzní metody. Ze 40 vzorků od pacientů trpících dermatofytózou bylo indentifikováno 13 kmenů dermatofytů, u kterých byl největší výskyt rezistence vůči flukonazolu: 39 kmenů (98 %) bylo odolných (Pakshir *et al.* 2009).

Dále pak byly v období mezi červencem 1992 a dubnem 1993 v Singapuru testovány rezistence vůči griseofulvinu, ketokonazolu a itrakonazolu. Ze 100 izolátů od pacientů trpících tinea capitis, faciei, corporis, cruris, manus, pedis a onychomykózou byly izolovány rezistentní kmeny *T. rubrum*, *T. interdigitale* a *T. mentagrophytes*. U *T. rubrum* se vyskytovala rezistence nejvíce vůči ketokonazolu (16 izolátů z 58 (28 %)) a u kmene *T. interdigitale* vůči griseofulvinu (4 kmeny ze sedmi (57 %)) a vůči ketokonazolu (4 ze sedmi (57 %)) (Goh *et al.* 1994).

3.2. Amerika - Mexiko

Také v Mexiku byla zaznamenána antifungální rezistence u dermatofytů, a to konkrétně k azolovým derivátům. Manzano-Gayosso *et al.* (2008) popisuje rezistenci u pacientů z nemocnice v Mexico City. Azolovými antimykotiky (itrakonazol, ketokonazol a flukonazol) bylo léčeno 36 pacientů s dermatofytózou. Sedm izolátů (19 %) vykazovalo rezistenci (testováno pomocí E-testu). Všechny izoláty (tři kmeny *T. rubrum*, tři *T. mentagrophytes* a jeden *T. tonsurans*) byly rezistentní vůči flukonazolu, přičemž jeden izolát *T. rubrum* byl rezistentní ještě k itrakonazolu a ketokonazolu (Manzano-Gayosso *et al.* 2008).

3.3. Evropa – Dánsko, Španělsko a Švýcarsko

Studie Saunte *et al.* (2019) z Dánska studovala terbinafinovou rezistenci u 14 pacientů pomocí metody EUCAST. Sedm kmenů *T. rubrum* a dva kmeny *T. interdigitale* od těchto pacientů (64 %) vykazovalo vysokou rezistenci k terbinafinu (MIC: 4-8 mg/L), dva kmeny *T. rubrum* (14 %) byly středně rezistentní (MIC: 1-2 mg/L), a tři *T. rubrum* (21 %) s nízkou rezistencí (MIC:

0,125-0,25 mg/L)(Saunte *et al.* 2019).

Dále pak studie Carrillo-Muñoz *et al.* (2004) testovala rezistenci u 250 kmenů pomocí difúzní metody NeoSensitabs. Izoláty pocházely od pacientů z různých nemocnic ve Španělsku. Největší výskyt rezistence u *T. rubrum* byl u flukonazolu - 36 izolátů z 86 (42 %). U kmenů *T. mentagrophytes* byl největší výskyt rezistence u flukonazolu (30 případů z 43 (70 %)) a u izokonazolu (20 případů z 43 (46 %)). U *M. canis* byla nejčastější rezistence opět u flukonazolu - 11 případů z 34 (32 %). Ze studie tedy vyplývá, že největší odolnost dermatofytů byla vůči flukonazolu, přičemž terbinafin byl poměrně účinný. Všechna data ze studie jsou shrnuta v Tabulce 2. (Carrillo-Muñoz *et al.* 2004).

I ve Švýcarsku byla zkoumána prevalence rezistence, kdy bylo potvrzených ~1 % terbinafin-rezistentních případů (17 z 2056 izolátů) (Yamada *et al.* 2017).

Pro nedostatek dat a studií věnovaným epidemiologickému rozšíření antifungálních rezistencí u dermatofytů nelze zhodnotit situaci v dalších státech.

Tabulka 2: Souhrn výskytu rezistencí vůči antimykotikům u dermatofytů zjištěných v různých státech světa

Stát	Antimykotikum ²	Druh	Počet rezistentních kmenů	Metoda měření	Citace
Dánsko	Terbinafin	<i>T. interdigitale</i> , <i>T. rubrum</i>	9/14 (64 %) ³	EUCAST AFST	Saunte <i>et al.</i> (2019)
		<i>T. mentagrophytes</i>	3/31 (10 %)	DDM	Khatri <i>et al.</i> (2017)
	Griseofulvin	<i>Trichophyton sp.</i>	72/129 (56 %)	CLSI M38-A2	Singh <i>et al.</i> (2019)
		<i>T. tonsurans</i>	1/12 (8 %)	DDM	Khatri <i>et al.</i> (2017)
		<i>T. interdigitale</i>	13/63 (21 %)	CLSI M38-A2	Singh <i>et al.</i> (2018)
Indie	Itrakonazol	<i>T. tonsurans</i>	4/12 (33 %)		
		<i>T. mentagrophytes</i>	3/31 (10 %)		
	Ketokonazol	<i>T. rubrum</i>	2/13 (14 %)		
		<i>T. mentagrophytes</i>	7/31 (23 %)	DDM	Khatri <i>et al.</i> (2017)
	Klotrimazol	<i>T. rubrum</i>	5/13 (39 %)		
		<i>T. tonsurans</i>	5/12 (42 %)		
		<i>T. verrucosum</i>	2/9 (22 %)		

² Výskyt rezistencí vůči flukonazolu nebyl sledován kvůli přirozené rezistenci převážné většiny dermatofytů vůči tomuto antimykotiku. Flukonazol slouží především k léčbě kvasinkových infekcí.

³ MIC: 4-8 mg/L

	Sertakonazol	<i>T. interdigitale</i>	23/63 (37 %)	CLSI M38-A2	Singh <i>et al.</i> (2018)
		<i>T. interdigitale</i>	20/63 (32 %)		
		<i>T. mentagrophytes</i>	202/279 (72 %)		
	Terbinafin	<i>T. mentagrophytes</i>	19/31 (61 %)	DDM ⁴	Khatri <i>et al.</i> (2017)
		<i>T. rubrum</i>	8/18 (44 %)	CLSI M38-A2	Ebert <i>et al.</i> (2020)
		<i>T. rubrum</i>	5/35 (14 %)		Rudramurthy <i>et al.</i> (2018)
		<i>T. rubrum</i>	4/13 (31 %)	DDM	Khatri <i>et al.</i> (2017)
		<i>Trichophyton sp.</i>	47/129 (36 %)	CLSI BMD	Singh <i>et al.</i> (2019)
		<i>T. tonsurans</i>	6/12 (50 %)	DDM	Khatri <i>et al.</i> (2017)
		<i>T. verrucosum</i>	7/9 (78 %)		
	Vorikonazol	<i>T. interdigitale</i>	7/63 (11 %)	CLSI M38-A2	Singh <i>et al.</i> (2018)
Írán	Griseofulvin		3/40 (8 %)	DDM	Pakshir <i>et al.</i> (2009)
	Ketokonazol	<i>Různé dermatofyty</i>	5/40 (13 %)		
	Terbinafin		1/40 (3 %)		
Singapur	Griseofulvin	<i>T. interdigitale</i>	4/7 (57 %)	Diluční metoda (nespecifikováno)	Goh <i>et al.</i> (1994)
		<i>T. mentagrophytes</i>	2/10 (20 %)		
		<i>T. rubrum</i>	10/58 (17 %)		
	Itrakonazol	<i>T. interdigitale</i>	3/7 (43 %)		
		<i>T. mentagrophytes</i>	2/10 (20 %)		
		<i>T. rubrum</i>	14/58 (24 %)		
	Ketokonazol	<i>T. rubrum</i>	16/58 (28 %)		
		<i>T. interdigitale</i>	4/7 (57 %)		
		<i>T. mentagrophytes</i>	1/10 (10 %)		
Španělsko	Itrakonazol	<i>M. canis</i>	4/34 (12 %)	DDM NeoSensitabs	Carrillo-Muñoz <i>et al.</i> (2004)
		<i>T. mentagrophytes</i>	11/43 (26 %)		
		<i>T. rubrum</i>	10/86 (12 %)		
	Izokonazol	<i>M. canis</i>	4/34 (12 %)		
		<i>T. mentagrophytes</i>	20/43 (46 %)		
		<i>T. rubrum</i>	9/86 (10 %)		
	Mikonazol	<i>T. mentagrophytes</i>	7/43 (16 %)		
		<i>T. rubrum</i>	7/86 (8 %)		
	Terbinafin	<i>T. mentagrophytes</i>	1/43 (2 %)		
		<i>T. rubrum</i>	3/86 (3 %)		

⁴ Difúzní disková metoda

4. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá mechanismy účinku vybraných tříd antimykotik a molekulárními mechanismy rezistence vůči nim, které jsou známy u dermatofytů. Dále práce shrnuje známá data o výskytu rezistence u dermatofytů ve světě.

Dermatofytózy jsou léčeny různými třídami antimykotik, které se od sebe liší chemickou strukturou a mechanismem účinku. Patří mezi ně azolové deriváty, allylaminová, benzofuranová, morfolinová a pyridinová antimykotika. Rezistenci si dermatofyty vyvinuly pouze k některým antimykotikům, a sice k terbinafinu, azolovým antimykotikům a griseofulvinu.

Mechanismus účinku terbinafinu spočívá v inhibici enzymu SQLE, který je podstatný při tvorbě ergosterolu, jenž je důležitou součástí buněčných membrán. Rezistence k terbinafinu je způsobená bodovými mutacemi v genu pro SQLE vedoucí k tvorbě aminokyselinových substitucí v aktivním centru enzymu, kam se následně nemůže terbinafin navázat. Tyto rezistence se vyskytují převážně u pacientů z Indie, kde je počet případů selhání léčby vysoký a u některých druhů může dosahovat až 72 % (Ebert *et al.* 2020).

Azolová antimykotika inhibují enzym cytochrom P450 dependentní C14 α -demetylázu, která katalyzuje přeměnu lanosterolu na ergosterol. Griseofulvin naopak působí na dynamiku a funkci mikrotubulů v buňce a zabraňuje tak buněčnému dělení. Rezistence vůči těmto léčivům je spojená se zvýšenou expresí efluxních transportérů, které vypuzují léčiva z buňky a snižují tak jejich cytoplazmatickou koncentraci. Poměrně častý výskyt tohoto typu rezistencí byl také zaznamenán v Indii (Dogra & Narang 2017). Dermatofyty bývají nejodolnější ke griseofulvinu, který je celosvětově nejdéle používaným antimykotikem a ke flukonazolu, u kterého je důvodem odolnosti kmenů přirozená rezistence většiny dermatofytů.

Záznamy o rezistencích u dermatofytů byly v minulosti málo běžné. V posledních letech se toto téma ale stalo velmi skloňovaným kvůli zvýšenému zachytu rezistentních kmenů v různých částech světa. Nejhorší situace je v Indii, kde dochází k výskytu kmenů velmi odolných k terbinafinu, ale i k azolovým antimykotikům či griseofulvinu. Příčinou těchto problémů je pravděpodobně široká dostupnost (bez preskripce) kombinovaných preparátů obsahujících kortikosteroidy v kombinaci s antimykotiky či antibiotiky, neadekvátní samoléčba velké části nakažených, nedodržování správného dávkování léčiva pacientem nebo nedokončení léčebného cyklu, který trvá týdny až měsíce. Takovéto dlouhodobé vystavování dermatofytů suboptimálním koncentracím antimykotik způsobuje selekci odolných kmenů a rozvoj

rezistencí. Proto by se měly dodržovat správné léčebné postupy, zejména volba vhodného antimykotika a lékové formy, správné dávkování léčiva, dodržování hygienických opatření a podobně.

V oblastech s vysokým výskytem rezistence by měla být upravena léčebná schémata na základě znalosti lokální epidemiologické situace, a také by mělo být přistoupeno k rutinnímu testování citlivosti klinických izolátů vůči antimykotikům. Detekce rezistentních kmenů má totiž v praxi velký význam a zamezuje dalšímu zhoršování epidemiologické situace. Laboratorní testování citlivostí dermatofytů k antimykotikům (měření MIC) by se mělo stát v době šíření rezistencí širší praxí a garantovat používání vhodných léčiv. Vzhledem k nedostatku studií a laboratorního testování nejsou stále definované breakpointy pro rezistence u dermatofytů, a proto je stanovování rezistentních kmenů pouze přibližné. Se stoupajícím výskytem rezistence, stoupá i potřeba jasného stanovení těchto interpretačních breakpointů pro rezistenci pro klinickou praxi.

5. Seznam literatury

- Adams BB 2002. Tinea corporis gladiatorum. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 47:286–290.
- Araujo OE, Flowers FP, King MM 1990. Griseofulvin: A new look at an old drug. *DICP, The Annals of Pharmacotherapy* 24:851–854.
- Arenas R, Moreno-Coutiño G, Vera L, Welsh O 2010. Tinea incognito. *Clinics in Dermatology* 28:137–139.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W 2020. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. *Clinical Microbiology and Infection* 18:246–247.
- Aytoun RSC, Campbell AH, Napier EJ, Seiler DAL 1960. Mycological Aspects of Action of Griseofulvin Against Dermatophytes. *A. M. A. Archives of Dermatology* 81:650–656.
- Becker LE 1984. Griseofulvin. *Symp. Superficial fungal Infections* 2:115–119.
- Bohn M, Kraemer KT 2000. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 43:57–69.
- Bonifaz A, Archer-Dubon C, Saúl A 2004. Tinea imbricata or Tokelau. *International Journal of Dermatology* 43:506–510.
- Burkhart CN, Burkhart CG, Gupta AK 2002. Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. *Journal of the American Academy of Dermatology* 47:629–631.
- Carrillo-Muñoz AJ, Guglietta A, Palacín C, Casals J, Del Valle O, Guardiola C, Rodríguez V, Quindós G 2004. In vitro antifungal activity of sertaconazole compared with nine other drugs against 250 clinical isolates of dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Chemotherapy* 50:308–313.
- Cervellati EP, Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Martinez-Rossi NM 2006. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology* 44:141–147.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL 2010. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8:267–276.
- Degreef H. 2008. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia* 166:257–265.
- Dimitrios I Z, Bennett J E 2008. Update on Azole Antifungals. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 29:198–210.
- Dogra S, Narang T. 2017. Emerging atypical and unusual presentations of dermatophytosis in India. *Clinical Dermatology Review* 1:12–18.
- Dogra S, Shaw D, Rudramurthy S 2019. Antifungal drug susceptibility testing of dermatophytes: Laboratory findings to clinical implications. *Indian Dermatology Online Journal* 10:225–233.
- Dogra S, Uprety S 2016. The menace of chronic and recurrent dermatophytosis in India: Is the problem deeper than we perceive? *Indian Dermatology Online Journal*. 7:73–76.
- Ebert A, Monod M, Salamin K, Burmester A, Uhrlaß S, *et al.* 2020. Alarming India wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses* 00:1–12.
- Elewski BE 1998. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Clinical Microbiology Reviews* 11:415–429.
- Erbagci Z 2004. Topical therapy for dermatophytoses: Should corticosteroids be included? *American Journal of Clinical Dermatology* 5:375–384.
- Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W, Martinez-Rossi NM 2006. Role of the ABC transporter

- TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *Journal of Medical Microbiology* 55:1093–1099.
- Favre B, Ryder NS 1997. Differential inhibition of fungal and mammalian squalene epoxidases by the benzylamine SDZ SBA 586 in comparison with the allylamine terbinafine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340:265–269.
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ 1996. Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:279–291.
- Ghannoum M 2016. Azole resistance in dermatophytes: Prevalence and mechanism of action. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 106:79–86.
- Goh Ch-L, Tay YK, Ali KB, Koh MT, Seow CS 1994. in Vitro Evaluation of Griseofulvin, Ketoconazole, and Itraconazole Against Various Dermatophytes in Singapore. *International Journal of Dermatology* 33:733–737.
- Granade TC, Artis WM 1980. Antimycotic susceptibility testing of dermatophytes in microcultures with a standardized fragmented mycelial inoculum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 17:725–729.
- Hainer BL 2003. Dermatophyte infections. *American Family Physician* 67:101-109.
- Hayes JD, Wolf CR 1991. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochemical Journal* 272:281–295.
- Hubka V, Čmoková A, Peano A *et al.* 2018. Zoonotické dermatofytózy: klinický obraz, diagnostika, etiologie, léčba, epidemiologická situace u nás. *Česko-slovenská dermatologie* 205–292.
- Ilkit M, Durdu M, Karakaş M 2012. Cutaneous id reactions: A comprehensive review of clinical manifestations, epidemiology, etiology, and management. *Critical Reviews in Microbiology* 38:191–202.
- Kano R, Kimura U, Kakurai M, Hiruma J, Kamata H *et al.* *Trichophyton indotineae* sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. *Mycopathologia*
- Khatri PK, Kachhawa D, Maurya V, Meena S, Bora A *et al.* 2017. Antifungal Resistance Pattern among Dermatophytes in Western Rajasthan. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:499–509.
- Kolář M 2016. Interpretace bakteriální citlivosti/rezistence k antibiotikům. *Klinická Mikrobiologie a infekční lékařství* 22:105–109.
- Kosanke S, Hamann L, Kupsch C, Moreno-Garcia S, Chopra A, Gräser Y 2018. Unequal distribution of the mating type (MAT) locus idiomorphs in dermatophyte species. *Fungal Genetics and Biology* 118:45–53.
- Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R 2008. Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico. *Gaceta Medica de Mexico* 144:23–26.
- Marriott MS 1980. Inhibition of Sterol Biosynthesis in *Candida albicans* by Imidazole-containing Antifungals. *Journal of General Microbiology* 117:253-255.
- Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 166:369–383.
- Martins MP, Franceschini ACC, Jacob TR, Rossi A, Martinez-Rossi NM 2016. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. *Journal of Medical Microbiology* 65:605–610.
- Mayser P, Gräser Y 2020. Superficial fungal infections. *Harper's Textbook of Pediatric Dermatology* 41:716–718.
- Metin B, Heitman J 2017. Sexual Reproduction in Dermatophytes. *Mycopathologia* 182:45–55.
- Monod M 2019. *Trichophyton rubrum* Azole Resistance Mediated by a New ABC Transporter TruMDR3.

- Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA 2003. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:82–86.
- Nair AB, Sammeta SM, Vaka SRK, Murthy SN 2009. A study on the effect of inorganic salts in transungual drug delivery of terbinafine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61:431–437.
- Nowosielski M, Hoffmann M, Wyrwicz LS, Stepniak P, Plewczynski DM *et al.* 2011. Detailed mechanism of squalene epoxidase inhibition by terbinafine. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51:455–462.
- Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:956–964.
- Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS 2005. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:2840–2844.
- Pakshir K, Bahaedinie D, Rezaei Z, Zodaifi MZ 2009. In vitro activity of six antifungal drugs against clinically important dermatophytes. *Jundishapur Journal Microbiology* 2:158–163.
- Pfaller MA 2012. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *American Journal of Medicine* 125:3–13.
- Polak A 1999. The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses* 42:355–370.
- Polak A 1992. Preclinical data and mode of action of amorolfine. *Clinical and Experimental Dermatology* 17:8–12.
- Pujol I, Capilla J, Fernández-Torrez B, Ortoneda M, Guarro J 2002. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology* 40:2618–2621.
- Rathinasamy K, Jindal B, Asthana J, Singh P, Balaji PV, Panda D 2010. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. *BMC Cancer* 10:6–8.
- Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K 2018. Cross Mutation in the Squalene Epoxidase Gene of *Trichophyton*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62:1–9.
- Ryder NS 1992. Terbinafine: Mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *British Journal of Dermatology* 126:2–7.
- Sahoo A, Mahajan R 2016. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatology Online Journal* 7:77.
- Saunte DML, Hare RK, Jørgensen KM, Jørgensen R, Deleuran M *et al.* 2019. Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: Clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations, and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63:1–19.
- Schindler J 2010. Mikrobiologie: Pro Studenty Zdravotnických Oborů. *Grada Publishing a.s.*
- Sentamilselvi G, Kamalam A, Ajithadas K, Janaki C, Thambiah AS 1997. Scenario of chronic dermatophytosis: An Indian study. *Mycopathologia* 140:129–135.
- Simpanya MF 2000. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. *Revista Iberoamericana de Micologia* 17:1–11.
- Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M *et al.* 2018. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*

61:477–484.

- Singh A, Masih A, Monroy-Nieto J, Singh PK, Bowers J *et al.* 2019. A unique multidrug-resistant clonal *Trichophyton* population distinct from *Trichophyton mentagrophytes*/*Trichophyton interdigitale* complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: Genomic insights and resistance profile. *Fungal Genetics and Biology* 133:1-9.
- Subissi A, Monti D, Togni G, Mailland F 2010. Ciclopirox: Recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs* 70:2133–2152.
- Suchopár J, Šimek R 1999. Remedia Compendium. *Panax Co, spol s.r.o. 3. vydání ed.*
- Sultana R, Wahiduzzaman M 2019. Emerging threat in antifungal resistance on superficial dermatophyte infection. *Bangladesh Medical Journal Khulna* 51:21–24.
- Turnidge J, Paterson DL 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews* 20:391–408.
- Verma SB, Vasani R 2016. Male genital dermatophytosis – clinical features and the effects of the misuse of topical steroids and steroid combinations – an alarming problem in India. *Mycoses* 59:606–614.
- Weitzman I, Summerbell RC 1995. the Dermatophytes. *Biological Reviews* 10:208–233.
- Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T *et al.* 2017. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61:1–13.
- Zhang JP, Wei YH, Zhou Y, Li YQ, Wu XA 2012. Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: A comparative study. *Archives of Pharmacal Research* 35:109–117.
- Zhang Y, Rao R 2010. Beyond ergosterol. *Virulence* 1:1–4.